

Marcadores SSR em batata: importante técnica para auxiliar no registro e proteção de cultivares

Caroline Marques Castro¹
Arione da Silva Pereira²
Graziela Nolasco³
Mariane Schüller³

Introdução

Em dezembro de 1997 passou a vigorar no Brasil a legislação para a proteção de cultivares, garantindo os direitos dos obtentores de novas variedades vegetais. Para que uma cultivar seja protegida, ela deve ser um produto de melhoramento genético; ser de uma espécie passível de proteção no Brasil; não haver sido comercializada no exterior há mais de quatro anos, ou há mais de 6 anos, no caso de videiras ou árvores; não haver sido comercializada no Brasil há mais de um ano; ser distinta; ser homogênea e ser estável. Estes três últimos requisitos são comprovados por meio de experimentos específicos, chamados de testes de DHE (Distingüibilidade, Homogeneidade e Estabilidade). A distingüibilidade de uma cultivar é baseada em suas diferenças com relação a qualquer outra cultivar cuja existência na data do pedido de proteção seja reconhecida. A homogeneidade refere-se à uniformidade entre plantas dentro da mesma geração, enquanto que a estabilidade refere-se à manutenção das características através de gerações sucessivas (SNPC, 2008).

Os testes DHE são baseados em descritores morfológicos específicos para cada espécie. Para a batata, *Solanum tuberosum* L., foi publicada pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) uma lista com 33 descritores morfológicos. No Brasil, atualmente, estão protegidas pelo SNPC 61 cultivares de batata (MAPA, 2008).

Embora os descritores morfológicos sejam essenciais para caracterizar uma cultivar, o número crescente de variedades que a cada ano vem sendo desenvolvido e que conseqüentemente solicitarão registro e proteção, resultará no fato de que em algumas situações, a distingüibilidade da nova variedade será difícil de ser obtida apenas com base nos caracteres morfológicos. Considerando este ponto de vista, o uso de marcadores moleculares como descritores complementares aos morfológicos a fim de auxiliar na identificação e discriminação dos novos materiais genéticos é uma perspectiva com grandes chances de se tornar uma realidade (RIEK et al., 2001).

¹Eng. Agrôn., D.S., Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403, 96001-970, Pelotas, RS. (caroline@cpact.embrapa.br)

²Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403, 96001-970, Pelotas, RS. (arione@cpact.embrapa.br)

³Acadêmica do curso de Biologia, estagiária da Embrapa Clima Temperado.

Comparada aos caracteres morfológicos, a genotipagem com marcadores moleculares oferece algumas vantagens na identificação de cultivares, uma vez que a caracterização molecular é independente das condições ambientais, do estágio fenológico da planta e apresenta a possibilidade de ser realizada precocemente e de forma rápida (BERNET et al., 2003).

Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*), por serem co-dominantes, altamente polimórficos e com alta reproducibilidade, são considerados os mais adequados para a identificação de cultivares (JONES et al., 1997; SPOONER et al., 2005). A principal restrição ao uso de SSR na genotipagem de cultivares se deve ao fato de que, para algumas espécies, poucos, ou até mesmo nenhum par de *primers* que amplificam um *locus* SSR foi identificado.

Entretanto, esse não é o caso da batata, onde mais de 100 *locus* SSR são descritos na literatura (GHISLAIN et al., 2004; SPOONER et al., 2007).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar o poder discriminatório de 12 *loci* SSR na caracterização de cultivares de batata oriundas de programas de melhoramento do Sul do Brasil, sendo que sete destas variedades apresentam algum grau de parentesco.

Material e Métodos

No total, foram caracterizadas 18 cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.). Destas, 14 são de origem brasileira, desenvolvidas por programas de melhoramento genético do Sul do Brasil, três são européias e uma é americana (Tabela 1).

Tabela 1. Origem e genealogia das cultivares de batata caracterizadas com marcadores SSR.

Cultivar	País de origem	Genealogia
Canguçu	Brasil	Benedikta x Delta
Cerrito Alegre	Brasil	Bintje x Baronesa
Piratini	Brasil	Delta x Colorada
Santo Amor	Brasil	Konsuragis x Baronesa
Trapeira	Brasil	Baronesa PR x Baronesa PR
Baronesa	Brasil	Loman OP
Macaca	Brasil	*
Catucha	Brasil	2-CRI-1149-1-78 x AC-999-263-70
Cristal	Brasil	CRI-420-12-60 x C-368-8-60
Eliza	Brasil	Edzina x Recent
Monte Bonito	Brasil	Baronesa x Hydra
Pérola	Brasil	2-CRI-1149-1-78 x Granola
Cascata	Brasil	Bintje x Baronesa
Santa Silvana	Brasil	Baronesa PRI x Baronesa PRII
Elvira	Alemanha	W.-ST x Clivia
Monalisa	Holanda	Bierma A1-287 x Colmo
Asterix	Holanda	Cardinal x SVPVe 709
Atlantic	Estados Unidos da América	Wauseon x B5451 (Lenape)

*desconhecida, provavelmente foi desenvolvida a partir de escape de clones gerados no IPEAS, Pelotas, RS (Pereira & Castro, 2006).

A caracterização das variedades foi realizada com base em 12 *loci* SSR (GHISLAIN et al., 2004): STGBSS; STWAX-2; STM1017; STM1053; STPoAc58; STM1052; STM1064; STM1058; STM1031; STM1016; STM1104; STM1106; STM1016 (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo 30 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP e 1U de *Taq* em 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl e 0,001% de gelatina. As reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com o seguinte programa: 3 min a

94°C, 2 min a temperatura de anelamento (T_a) de cada *primer* (Tabela 2) e 1 min 30s a 72°C seguido de 29 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a T_a e 1 min 30s a 72°C com uma extensão final de 5 min a 72°C.

Aos produtos da PCR foi adicionado, na proporção 1:2, solução tampão de carregamento (formamida deionizada 99%, EDTA 10 mM, 0,025% de xileno-ciano e 0,025% de azul de bromofenol). As amostras foram desnaturadas por 5 min a 94°C. Foram aplicados 4,0 µL desta solução em gel de seqüenciamento (poliacrilamida 6% p/v, uréia 7 M).

Tabela 2. *Loci* SSR usados na caracterização das cultivares de batata.

<i>Loci</i>	Seqüência dos <i>primers</i> (5' - 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Cromossomo
STGBSS	AAT CGG TGA TAA ATG TGA ATG C ATG CTT GCC ATG TGA TGT GT	53	VIII
STWAX-2	CCC ATA ATA CTG TCG ATG AGC A GAA TGT AGG GAA ACA TGC ATG A	53	VIII
STM1017	GAC ACG TTC ACC ATA AAA AGA AGA ATA GCA AAG CAA	53	IX
STM1053	TCT CCC CAT CTT AAT GTT TC CAA CAC AGC ATS CAG ATC ATC	55	III
STPoAc58	TTG ATG AAA GGA ATG CAG CTT GTG ACG TTA AAG AAG TGA GAG TAC GAC	57	V
STM1052	CAA TTT CGT TTT TTT CAT GTG ACA C ATG GCG TAA TTT GAT TTA ATA CGT AA	57	VII
STM1064	GTT CTT TTG GTG GTT TTC CT TTA TTT CTC TGT TGT TGC TG	55	II
STM1058	ACA ATT TAA TTC AAG AAG CTA GG CCA AAT TTG TAT ACT TCA ATA TGA	55	III
STM1031	TGT GTT TGT TTT TCT GTA T AAT TCT ATC CTC ATC TCT A	55	V
STM1016	TTC TGA TTT CAT GCA TGT TTC C ATG CTT GCC ATG TGA TGT GT	53	VIII
STM1104	TGA TTC TCT TGC CCT ACT GTA ATC G CAA AGT GGT GTG AAG CTG TGA	57	VIII
STM1106	TCC AGC TGA TTG GTT AGG TTG ATG CGA ATC TAC TCG TCA TGG	55	X

Fonte: Ghislain et al., 2004.

A corrida eletroforética foi de 2 h a 70 W. Os fragmentos amplificados foram visualizados após coloração do gel com nitrato de prata, seguindo protocolo descrito por Creste et al. (2001). O tamanho dos alelos foi estimado em comparação com o marcador de peso molecular de DNA de 10 bp (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Para cada *locus* SSR, os alelos receberam nota um quando presente, e zero quando ausente. Com base no coeficiente de Jaccard, os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA. Foi estimado o coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de similaridade e o dendrograma. As análises foram realizadas com o programa NTSYS-pc (Rohlf, 2005).

Resultados e Discussão

Os 12 *loci* SSR analisados permitiram a

separação das 18 cultivares avaliadas, comprovando a grande capacidade dos marcadores SSR em discriminar e identificar variedades de batata (KAWCHUK et al., 1996; SPONNER et al., 2007). A análise de correlação cofenética entre o dendrograma e a matriz de similaridade foi de 82,3%. Seis grandes grupos foram formados (Figura 1). A cultivar Santo Amor, assim como a Asterix, foram localizadas em grupos isolados e distintos, com 45% de similaridade, sendo os acessos mais distantes. A máxima similaridade foi encontrada entre as cultivares Baronesa e Santa Silvana, 86%. Esta variedade tem origem em um cruzamento entre dois clones oriundos da 'Baronesa', justificando a alta similaridade encontrada. Por outro lado, 'Cascata' e 'Cerrito Alegre', ambas oriundas do mesmo cruzamento, foram agrupadas em grupos distintos, com 60% de similaridade, mostrando a alta heterogeneidade dos seus genitores para os *loci* avaliados, 'Bintje' x 'Baronesa'.

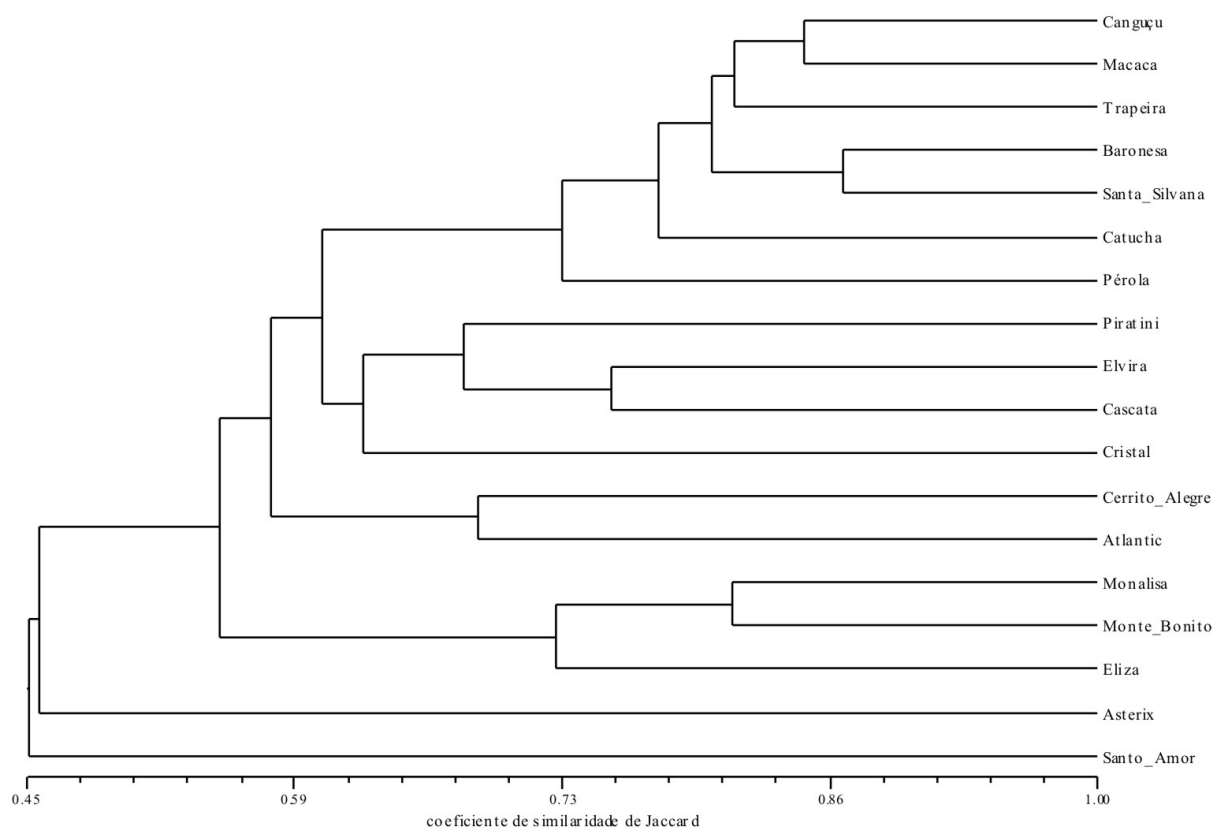


Figura 1. Agrupamento de 18 cultivares de batata pelo método UPGMA obtido a partir da análise de 12 *loci* SSR com base no coeficiente de similaridade de Jaccard.

A análise dos 12 *loci* SSR resultou na identificação de 48 alelos no germoplasma avaliado. O *primer* STM1016 foi o que apresentou maior diversidade, sendo identificados seis alelos, seguido pelo STWAX e STM1104, com cinco; STM1106, STGBSS, STM1052 e STM1064 com quatro; STM1031 com três e STM1017, STM1053, STPOAc58 e STM1058 com dois alelos.

O perfil genotípico de cada cultivar, resultante da combinação dos 12 *loci* SSR analisados, foi único. Mesmo com a análise de um número relativamente pequeno de *loci* SSR, foi possível discriminar e caracterizar cultivares de batata que apresentam genitores em comum na sua origem (Tabela 3).

Estes dados apóiam a adoção de marcadores SSR como informações complementares

aos descritores morfológicos no processo de proteção de cultivares. Entretanto, para que o emprego desta técnica realmente venha a contribuir com o processo de proteção de cultivares, é importante que especial atenção seja dada à padronização dos protocolos e que também sejam usados genótipos em comum nas análises moleculares para que estes sirvam de referência para a padronização dos pesos moleculares e permitam a comparação de cultivares analisadas em laboratórios distintos.

Associada à alta reproducibilidade dos marcadores SSR (JONAS et al., 1997), os resultados obtidos no presente trabalho sustentam a adoção dos marcadores SSR como técnica complementar na caracterização e descrição de variedades submetidas ao processo de proteção de cultivares.

Tabela 3. Perfis genotípicos das cultivares de batata que apresentam na sua genealogia a cultivar Baronesa. Perfis com base em 12 *loci* SSR expressos em tamanho dos fragmentos amplificados (pares de base).

<i>Primer:</i>	'Cerrito Alegre'	'Santo Amor'	'Trapeira'	'Monte Bonito'	'Cascata'	'Santa Silvana'	'Baronesa'
STGBSS	135 / 132 / 128	135 / 132	132	132	135 / 132 / 128	132	132
STWAX-2	239 / 225	228 / 225	239 / 228	248 / 239 / 228	239 / 228 / 225	239 / 228	239 / 228
STM 1017	129	129	133 / 129	129	129	129	129
STM 1053	172 / 169	172 / 169	172	172	172 / 169	172	172
SPOAc 58	231	231 / 228	231 / 228	231	231	231 / 228	231 / 228
STM 1052	225 / 210	225 / 217 / 250	225 / 210	210	210 / 250	225	225 / 210 / 250
STM 1064	188 / 191	191 / 194	188 / 191	188 / 191	188 / 194	*	188 / 191 / 194
STM 1058	114	114	*	*	117 / 114	117 / 114	117 / 114
STM 1031	*	265 / 184	265	265 / 184	*	*	265 / 184
STM 1104	*	172 / 165	168 / 165	168	172 / 168 / 163	168	168
STM 1106	158 / 154	158 / 154 / 143	158 / 154	143 / 138	158 / 154	158 / 154	158 / 154
STM 1016	246 / 242 / 238	258 / 246	258 / 242	258 / 242	258 / 246 / 242 / 238	258 / 242	258 / 242

* não avaliado.

Considerações finais

Os resultados encontrados neste trabalho mostram o grande potencial discriminatório dos marcadores SSR, mesmo quando analisadas cultivares de batata com alto grau de parentesco.

Referências

BERNET, G. P.; BRAMARDI, S.; CALVACHE, D.; CARBONELL, E.A.; ASINS, M. J. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding*, Wageningen, v. 122, p. 146-152, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, Dordrecht, v. 19, p. 299-306, 2001.

GHISLAIN, M.; SPOONER, D. M.; RODRÍGUEZ, F.; VILLAMÖN, F.; NÚÑEZ, J.; VÁSQUEZ, C.; WAUGH, R.; BONIERBALE, M. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 108, p. 881-890, 2004.

JONAS, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M. O.; SALA, F.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSKI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v. 3, p. 381-390, 1997.

KAWCHUK, L. M.; LYNCH, D. R.; THOMAS, J.; PENNER, B.; SILLITO, D.; KULCSAR, F. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *American Potato Journal*, Orono, v. 73, p. 325-335, 1996.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2008 [Online]. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/Ist1200_11_11_2008.htm. Acesso em: 05.dez.2008

PEREIRA, A. DA S.; CASTRO, C. M. Batata 'Macaca' (Macaquinha, Rosa Redonda, Rosa Maçã). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico 147)

RIEK DE, J. Are molecular markers strengthening plant variety registration and protection? *Acta Horticulturae*, Bruxelas, v. 552, p. 215-223, 2001.

ROHLF, F.J. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. *Setauket: Applied Biostatistics*, 2005. v. 2.2.

SNPC - Serviço Nacional de Proteção de Cultivares 2008. Informações aos usuários do SNPC. Brasília, DF, 2008. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/servicos/cultivares/protecao/informacoes_usuarios_protecao. Acesso em: 05 dez. 2008.

SPOONER, D.; VANTREUREN, R.; VICENTE DE, M. C. Molecular markers for genebank management. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2005. 126 p. (IPGRI. Technical bulletin 10).

SPOONER, D. M.; NÚÑEZ, J.; TRUJILLO, G.; HERRERA, M.; GUZMAN, F.; GHISLAIN, M. Extensive SSR genotyping of potato landraces supports a drastic revaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 104, p. 19398-19403, 2007.

Comunicado Técnico, 198



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: Embrapa Clima Temperado
Endereço: Caixa Postal 403
Fone/fax: (53) 3275-8199
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão 2008: 50 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro
Secretário-Executivo: Joseane M. Lopes Garcia
Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Verneti Azambuja, Luís Antônio Suíta de Castro. Suplentes: Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes

Expediente

Revisão de texto: Sadi Sapper
Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos
Editoração eletrônica: Oscar Castro
Composição e Impressão: Embrapa Clima Temperado